

수용성 DDB유도체의 주사제 개발을 위한 급성독성 및 아급성독성시험연구

김준규 · 박창원 · 이윤숙 · 김정구 · 이치호¹ · 조대현*
식품의약품안전본부 독성부, ¹부산대학교 약학대학

Acute and Subacute Toxicity Studies of Water Soluble Dimethyl Dimethoxy Biphenylate Derivative in Rats

Jun Gyou Kim, Chang Won Park, Yoon Sook Lee, Jeong Goo Kim,
Chi Ho Lee¹ and Dae Hyun Cho*

Department of Toxicology, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong,
Eunpyung-gu, Seoul 122-020, Korea.

¹College of Pharmacy, Pusan National University

(Received November 17, 1997)

(Accepted November 20, 1997)

ABSTRACT: The acute and subacute toxicity of water soluble dimethyl dimethoxy biphenylate derivative (new DDB), hepatitis therapeutics, were investigated in SD rats. In the acute toxicity study, body weights and clinical signs were observed for 7 days after the intravenous injection of new DDB at doses of 140, 182, 236, 307 and 400 mg/kg(r=1.3). Death, Severe convulsion, tremor and decrease motor activity were observed in almost treated groups (except the 140 mg/kg treated group). Changes of body weight in treated groups were not significantly different from control group. Autopsy of survived animals revealed no abnormal gross findings related to new DDB. As a results, the LD₅₀ values of new DDB were 244.1 mg/kg for male and 232.5 mg/kg for female. In subacute toxicity study, body weights and clinical signs were observed after intravenous injection of new DDB at doses of 57, 75 and 100 mg/kg/day for 28 days. Death, decrease motor activity and tremor were observed above 75 mg/kg treated groups. Statistically significant changes were observed in hematological and biochemical parameters of new DDB-treated groups; however, these changes were within normal range and had no relationship with dosage. Several abnormal findings were observed in microscopic examination of tissue; however, these findings were not caused by new DDB but environmental factor. The no toxic dose level of new DDB were estimated to be 57 mg/kg/day in this study.

Key Words: Acute intravenous toxicity. Subacute intravenous toxicity. Water soluble dimethyl dimethoxy biphenylate derivative. Rats.

I. 서 론

새로운 간염치료제인 수용성 DDB(dimethyl dimethoxy biphenylate) 유도체는 백색의 분말로 기존 DDB의 난용성을 해결하여 주사제를 목적으로 개발된 신물질이다. 간기능회복과 만성 바이러스성 B형 간염에 효과가 있다고 밝혀진 오미자 성분 Schisandrin C의 합성중간체인 DDB는 현재 국내 여러 제약회사에서도 경구투여제제로 시판중이다. 그러나 이 DDB는 정맥주사제로의 개발이 절실함에도 불구하고 매우 난용성인 탓에 사용이 제한되고 있는 실정이다. 이에 본 시험연구에서는 DDB가 갖고 있는 고유의 생리활성을 유지

하면서 구조변경에 의하여 수용성을 높인 수용성 DDB유도체에 대한 신약개발과정에서 필요한 시험물질의 안전성을 평가하기 위해 랫드에 있어서 급성독성 시험 및 1개월 아급성독성시험을 실시하였다. 상기 시험은 식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 (94. 4. 16) 의약품등의 독성시험 기준에서 정하는 요건에 적합하게 실시되었다는 점도 밝혀두고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험물질

부산대학교 약학대학에서 수령하였으며 급성에 사용된 시험물질의 Lot No.는 DDB-S 1이었고 아급성독

*To whom correspondence should be addressed

성시험에 사용된 시험물질의 Lot No.는 DDB-S 2 이었다. 시험물질의 분자구조는 bis 2-alkylamino ethoxy dimethyl-4-4'-dimethoxy-5,5',6,6'-dimethoxy dioxy diphenyl-2,2' -dicarboxylate이다.

2. 사용동물 및 사육조건

본 실험은 식품의약품안전본부 독성연구소 동물실험실에서 수행하였고, 시험동물은 식품의약품안전본부 독성연구소 실험동물자원실에서 생산된 SPF SD계 랫드를 분양받아 약 1주일간 순화적응시킨후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 배기 10-15회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 150-300 Lux의 환경조건에서 폴리카보네이트 사육상자(280W × 400L × 1700H mm)에 넣어 실험하였으며, 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균한 다음 사용하였다. 물 섭취는 멸균 수도수를 시험동물에 자유로이 공급하였다. 또한 시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중범위는 수컷 277-341 g 및 암컷 182-249 g 이었고, 연령은 약 7-8주령이었다.

3. 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag표시법을 이용 실시하였다. 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 급성독성시험에서는 시험물질 투여군은 암수 모두 최저 140 mg/kg 최고 400 mg/kg 범위의 5 용량을 공비 1.3으로하여 설정하였고, 대조군에는 생리식염수를 투여하였으며 1개군당 암수 각 5마리씩 10마리로 6개군 총 30마리가 사용되었다. 1개월 아급성독성시험에서의 투여용량은 급성독성시험 및 아급성독성 예비시험결과를 토대로 3단계의 등비용량으로 고용량군(100 mg/5 ml/kg/day), 중용량군(75 mg/3.75 ml/kg/day) 및 저용량군(57 mg/2.85 ml/kg/day)으로 설정하였으며, 주사용생리식염수를 대조군(5 ml/kg/day)으로 하고 1일 1회 주 6회 총 28일간 정맥주사하였다. 각 군은 암수 각 10마리로 구성하였다.

4. 투여약액의 조제 및 투여방법

수용성 DDB유도체를 투여직전 생리식염수에 20 mg/ml 농도로 용시조제하여 사용하였으며 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 랫드에 1회 꼬리로 정맥주사하였다.

5. 급성독성시험

1) 일반증상관찰

모든 시험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 6시간까지는 매 시간마다, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회씩 관찰하였다.

2) 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일(0일), 투여후 1일, 3일, 5일, 7일째에 체중을 측정하였다.

3) 부검

시험 종료후 동물을 CO_2 로 가볍게 마취하고 설하동맥 및 복대동맥 절단방법으로 처사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였으며, 부검 직전 체중을 측정하였다.

4) 통계학적 분석

투여에 의한 체중 변화를 측정하기 위하여 Bartlett's test for homogeneity of variance를 실시한 후 one-way analysis of variance test 및 Scheffe's test를 실시하여 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. LD_{50} 값은 Pharmacologic Calculation System(Ver. 4.1; Springer-Verlag, NY, 1986)을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 95% 신뢰한계내에서 결정하였다.

6. 아급성독성시험

1) 일반증상관찰 및 체중측정

모든 시험동물에 대하여 매일 1회 일정시간에 관찰하여 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망발현유무를 관찰하였으며 시험동물의 체중측정은 시험기간 중 주 2회 측정 하였으며, 시험물질 투여전 및 부검당일에도 체중을 측정 하였다.

2) 부검 및 장기무게 측정

암·수 각 군당 10마리씩 총 80수의 Sprague Dawley계 랫드를 28일간 시험물질 투여 후에 부검을 실시

하였다. 부검 하루전에 절식을 하고 부검직전에 체중을 측정하였으며 이산화탄소 마취하에서 방혈 치사한 후 모든 장기에 대하여 육안소견을 관찰하였다. 또한 시험물질 투여후 부검한 전 동물에 대하여 심장, 간장, 신장, 비장 및 폐의 중량을 측정하였다.

3) 혈액학적 검사

부검전 1일간 절식시킨 후 CO₂로 마취시켜 심장체혈 하였다. 혈액은 EDTA로 항응고처리하고 자동혈구계산기 (Technicon사의 H1 system)를 이용하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 적혈구용적(PCV), 평균적혈구용적(MCV), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 임파구(Lymphocyte), 호중구(Neutrophil), 단구(Monocyte), 호산구(Eosinophil), 호염기구(Basophil) 등을 측정하였다.

4) 혈액생화학적 검사

혈액을 냉장고에 2시간정도 방치한후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 자동 혈청 생화학 분석기 (Technicon사의 RA-XT)를 이용하여 혈청내 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST), creatinine, blood urea nitrogen(BUN) 등을 측정하였다.

5) 조직병리검사

부검한 전 동물에 대하여 전 장기를 육안으로 관찰한 후에 간장, 신장, 비장, 심장 조직을 2-3 mm 두께로 삭정하여 10% 중성완충 포르말린으로 고정하였고, 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하였으며 포매한 조직을 3-5 μ m로 박절하여 Hematoxylin and Eosin 염색 후 검경하였다.

6) 통계학적 분석

체중변화 및 장기무게 측정자료의 통계학적 분석은 Bartlett's test for homogeneity of variance를 실시한 후 one-way analysis of variance test 및 Scheffé's test를 실시하여 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였으며 조직병리검사(장기무게등) 및 일반병리검사(혈액학적검사, 혈액생화학적 검사등)는 독성시험 통계 프로그램인 LABCAT을 이용하여 군간다중비교 (DUNCAN'S TEST)를 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 급성독성시험

1) LD₅₀과 일반증상관찰

투여결과 사망개체(사망개체수/투여개체수)는 최고용량군에서는 수컷 5/5, 암컷 5/5, 고용량군에서는 수컷 3/5, 암컷 4/5, 중등용량군에서는 수컷 3/5, 암컷 3/5, 저용량군에서 수컷 1/5, 암컷 2/5이었고 최저용량군에서는 사망개체가 없었다. 사망개체는 투여후 1시간 이내에 사망하였으며 그후 2~3시간 경과 후 생존개체는 모두 정상으로 회복되었다. 임상증상은 최저용량군을 제외한 모든 투여군에서 투여 직후 활동성 감소, 심한 통증을 수반한 경련, 진전이 용량의존적으로 나타났으며 LD₅₀ 치는 수컷 244.1 mg/kg, 암컷 232.5 mg/kg 이었다(Table 1, 2).

2) 체중변화

모든 투여용량군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

3) 육안적 부검소견

대조군과 모든 투여용량군에서 사망개체는 없었으며 생존개체에서도 별다른 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.

2. 아급성독성시험

1) 일반증상

대조군 및 시험물질 투여군에서 전 투여기간에 걸쳐 사망동물은 고용량군(100 mg/kg/day)에서 수컷 3수, 암컷 1수 및 중간용량군(75 mg/kg/day)에서 암컷 1수이었으며, 일반증상은 투여기간동안 약물투여직후 고용량군과 일부 중간용량군에서 활동성 감소 및 진전이 용량의존적으로 관찰되었다(Table 4, 5).

2) 체중변화

투여기간동안 체중을 측정한 결과, 시험물질 투여군에서 전 투여기간에 걸쳐 대조군에 비하여 유의성있는 체중변화가 관찰되지 않았다(Table 6, 7).

3) 부검소견

시험도중 폐사한 개체 및 생존한 개체의 부검한 결과 육안적으로 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 8, 9).

4) 장기무게 변화

사망개체나 생존개체에서 육안적 부검소견은 특이한 이상소견이 관찰되지 않았고 각 군의 장기에 대한

Table 1. Clinical signs of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative

Dose (mg/kg)	#Sex	Clinical signs	Hour							Day						
			After administration													
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	
0	M		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
140	M	DMA	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	DMA	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
182	M	DMA	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	DMA	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
236	M	DMA	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	DMA	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
307	M	DMA	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	DMA	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
400	M	Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	Tremor	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Conversion	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*M : male, F : female, DMA : decreased motor activity.

Table 2. Mortality and LD₅₀ values of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative

Sex	Dose (mg/kg)	Number of dead animals (Days after administration)							Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6			7
Male	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5	244.14 (193.5-308.0)
	400	5	-	-	-	-	-	-	-	5/5	
	307	3	-	-	-	-	-	-	-	3/5	
	236	3	-	-	-	-	-	-	-	3/5	
	182	1	-	-	-	-	-	-	-	1/5	
	140	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5	
Female	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5	232.46 (186.7-289.4)
	400	5	-	-	-	-	-	-	-	5/5	
	307	3	-	-	-	-	-	-	-	4/5	
	236	3	-	-	-	-	-	-	-	3/5	
	182	1	-	-	-	-	-	-	-	1/5	
	140	-	-	-	-	-	-	-	-	0/5	

() : 95% confidence limit.

절대중량과 상대중량을 측정된 결과 암컷 고용량군에서 간장과 좌측신장 및 총신장의 상대중량이 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다(P<0.05). 그 밖에 다른 유의성있는 결과는 관찰되지 않았다(Table 10).

5) 혈액학적 검사결과

대조군과 투여군간의 유의성 있는 변화를 보인 항목은 다음과 같다. 수컷 중간용량군과 저용량군에서 대조군과 비교하여 백혈구수가 유의성있게 감소하였고(P<

Table 3. Changes of body weight in rats intravenously injected with water soluble DDB derivative (Unit : g)

Dose (mg/kg)	Sex of animal	Days after administration			
		0	1	3	7
0	Male	[#] 295 ± 7.4(5)	302 ± 6.6(5)	311 ± 5.0(5)	334 ± 6.8(5)
	Female	198 ± 9.8(5)	193 ± 9.9(5)	203 ± 10.8(5)	214 ± 9.8(5)
140	Male	298 ± 10.6(5)	306 ± 12.7(5)	312 ± 10.7(5)	341 ± 11.2(5)
	Female	201 ± 8.8(5)	190 ± 7.2(5)	203 ± 7.6(5)	222 ± 10.2(5)
182	Male	296 ± 9.2(5)	304 ± 7.4(4)	315 ± 9.6(4)	339 ± 13.8(4)
	Female	201 ± 12.3(5)	208 ± 14.6(4)	219 ± 15.5(4)	236 ± 17.7(4)
236	Male	298 ± 15.6(5)	298 ± 0.7(2)	318 ± 16.3(2)	343 ± 20.5(2)
	Female	198 ± 20.0(5)	210 ± 30.4(2)	216 ± 35.3(2)	230 ± 38.1(2)
307	Male	290 ± 9.4(5)	900 ± 9.1(2)	327 ± 3.5(2)	353 ± 4.9(2)
	Female	192 ± 11.8(5)	190 ± 0.0(1)	194 ± 0.0(1)	209 ± 0.0(1)
400	Male	296 ± 12.7(5)			
	Female	199 ± 10.0(5)			

[#]Mean ± standard deviation, (n) : represent the number of animals.

Table 4. Survival/adjusted numbers of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Sex	Dose (mg/kg/day)	Days						end
		0	7	14	21	31		
Male	0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	57	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	75	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	100	10/10	9/10	8/10	7/10	7/10	7/10	TS
Female	0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	57	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	75	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	TS
	100	10/10	9/10	9/10	7/10	9/10	9/10	TS

TS : terminal sacrifice

Table 5. Clinical signs of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Sex	Dose (mg/kg/day)	Clinical signs	Days											
			1	2	3	4	5	7	10	14	17	21	26	31
Male	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	57	NAD	[#] 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	75	DMA	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	3
		Tremor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
		SS	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	100	DMA	5	5	3	3	3	5	6	6	8	7	7	7
Tremor		3	2	-	-	-	2	3	2	2	1	1	2	
SS		-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	
Female	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	57	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	75	DMA	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3
		Tremor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
		SS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	DMA	4	2	2	1	3	3	4	6	6	7	7	9
Tremor		2	-	-	-	-	2	3	2	2	1	1	2	

[#]Values are expressed as animal numbers.

NAD : no abnormalities detected, DMA : decreased motor activity, SS : soft stool

Table 6. Changes of body weight in male rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Dose (mg/kg/day)	Days										
	0	3	7	10	13	17	20	24	27	31	
0	[#] 307 ± 19.9	324 ± 20.2	350 ± 22.8	366 ± 23.7	377 ± 27.8	389 ± 30.5	416 ± 34.6	431 ± 38.0	437 ± 38.6	451 ± 38.7	
57	309 ± 22.4	327 ± 22.7	349 ± 22.4	369 ± 23.1	382 ± 22.9	391 ± 20.8	413 ± 20.8	423 ± 21.7	430 ± 21.0	446 ± 21.0	
75	309 ± 17.8	329 ± 21.5	357 ± 21.8	371 ± 24.5	385 ± 23.6	393 ± 23.3	413 ± 25.3	429 ± 27.8	440 ± 31.0	434 ± 42.1	
100	306 ± 18.9	327 ± 20.8	349 ± 21.7	366 ± 20.3	378 ± 21.8	396 ± 23.7	418 ± 26.5	426 ± 25.7	431 ± 31.5	446 ± 29.0	

[#]Values(unit : g) represent means ± standard deviation

Table 7. Changes of body weight in female rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Dose (mg/kg/day)	0									
	3	7	10	13	17	20	24	27	31	(Days)
0	^a 215±16.5	227±18.4	242±20.9	252±21.3	255±21.4	268±24.1	280±27.1	287±27.4	290±33.2	299±29.5
57	217±18.6	224±18.9	235±21.5	245±23.7	253±24.4	262±24.9	270±25.4	282±27.5	281±31.2	293±25.9
75	217±17.0	227±16.6	241±18.4	249±21.3	256±24.0	270±19.2	288±18.6	288±18.6	294±17.3	306±19.9
100	213±12.8	219±11.3	232±14.2	243±15.1	255±21.4	262±14.5	269±16.9	266±12.4	285±24.9	288±16.7

^aValues(unit : g) represent means ± standrd deviation

Table 8. Incidence of gross finding in male rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Group	Control	Low (57 mg/kg)	Middle (75 mg/kg)	High (100 mg/kg)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Stomach				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Heart				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Kidney				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Lung				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Spleen				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Adrenal GL				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Testes				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Pancreas				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)
Pancreas				
No. of observations	10	10	10	7
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	10(100%)	7(100%)

0.05), 암컷 고용량군과 중간용량군에서 적혈구수가 유의성 있게 감소하였다($P<0.01$, $P<0.05$). 암컷 고용량군에서 혈색소량과 적혈구용적이 유의성 있게 감소하였다($P<0.01$). 암컷 고용량군, 중간용량군, 저용량군에서

혈소판수가 유의성 있게 증가하였고($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$) 수컷 고용량군, 중간용량군, 저용량군에서 호중구수가 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). 수컷 중간용량군과 저용량군에서 단구수가 유의

Table 9. Incidence of gross finding in male rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Group	Control	Low (57 mg/kg)	Middle (75 mg/kg)	High (100 mg/kg)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Stomach				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Heart				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Kidney				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Lung				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Spleen				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Adrenal GL				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Testes				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Pancreas				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Thyroid GL				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)
Pancreas				
No. of observations	10	10	9	9
No. gross findings	10(100%)	10(100%)	9(100%)	9(100%)

Table 10. Absolute and relative organ weights in rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Group	Male				Female			
	Control	57 mg/kg	75 mg/kg	100 mg/kg	Control	57 mg/kg	75 mg/kg	100 mg/kg
Live(gm)	[#] 13.07±3.263	12.83±0.771	12.35±1.001	12.95±2.347	8.92±0.705	8.47±0.921	8.74±0.738	9.33±0.738
Rel.wt(%b.w)	2.89±0.070	2.86±0.013	2.84±0.027	2.90±0.099	2.97±0.078	2.89±0.069	2.85±0.014	3.23±0.027*
Kid.(L)(gm)	1.77±0.033	1.75±0.025	1.64±0.043	1.80±0.065	1.08±0.018	1.04±0.008	1.04±0.030	1.14±0.005
Rel.wt(%b.w)	0.39±0.001	0.39±0.000	0.37±0.002	0.40±0.003	0.36±0.000	0.35±0.002	0.33±0.002	0.39±0.000*
Kid(R)(gm)	1.79±0.032	1.79±0.024	1.66±0.055	1.69±0.032	1.08±0.027	1.04±0.008	1.09±0.010	1.13±0.007
Rel.wt(%b.w)	0.39±0.001	0.40±0.000	0.38±0.003	0.38±0.004	0.36±0.001	0.35±0.001	0.35±0.000	0.39±0.001
Kid(T)(gm)	3.57±0.124	3.55±0.090	3.30±0.195	3.50±0.240	2.16±0.087	2.75±4.420	2.13±0.052	2.27±0.021
Rel.wt(gm)	0.79±0.004	0.79±0.002	0.76±0.012	0.78±0.014	0.72±0.004	0.71±0.003	0.69±0.002	0.79±0.003*
Lung(gm)	0.90±0.030	1.82±0.119	1.94±0.045	1.78±0.149	1.58±0.029	1.65±0.053	1.59±0.024	1.56±0.012
Rel.wt(gm)	0.42±0.001	0.40±0.005	0.44±0.002	0.40±0.007	0.53±0.003	0.56±0.003	0.52±0.002	0.54±0.001
Spl.(gm)	0.93±0.024	0.88±0.004	0.85±0.009	0.83±0.022	0.69±0.002	0.67±0.007	0.75±0.004	0.69±0.006
Rel.wt(%b.w)	0.20±0.000	0.19±0.000	0.19±0.000	0.18±0.001	0.23±0.000	0.22±0.000	0.24±0.000	0.24±0.001
Heart(gm)	1.56±0.025	1.52±0.010	1.52±0.018	1.51±0.026	1.05±0.020	1.03±0.012	1.09±0.007	1.04±0.007
Rel.wt(%b.w)	0.34±0.000	0.34±0.000	0.35±0.000	0.34±0.000	0.35±0.000	0.35±0.000	0.35±0.000	0.36±0.000

[#]Values are expressed as means ± SD

*Significant difference from control (P<0.05)

Table 11. Hematological values of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Item	Male				Female			
	Control	High (100 mg/kg)	Medium (75 mg/kg)	Low (57 mg/kg)	Control	High (100 mg/kg)	Medium (75 mg/kg)	Low (57 mg/kg)
WBC($10^3/\mu\text{l}$)	12.45 ± 5.895	10.75 ± 4.026	7.52 ± 1.523*	8.37 ± 2.265*	8.88 ± 3.326	7.57 ± 3.817	7.94 ± 4.755	7.25 ± 2.722
RBC($10^3/\mu\text{l}$)	8.12 ± 0.436	7.88 ± 0.371	7.69 ± 0.555	8.05 ± 0.465	7.69 ± 0.194	7.19 ± 0.180**	7.45 ± 0.188*	7.80 ± 0.341
Hemoglobin(g/dl)	15.6 ± 0.53	15.4 ± 0.60	14.8 ± 1.06	15.3 ± 0.45	15.1 ± 0.15	14.3 ± 0.46**	14.9 ± 0.48	15.3 ± 0.66
PCV(%)	56.4 ± 2.51	56.7 ± 1.43	53.7 ± 3.89	56.2 ± 2.95	53.4 ± 1.21	50.3 ± 1.45**	52.5 ± 1.71	53.5 ± 2.87
MCV(fl)	69.5 ± 1.82	70.8 ± 3.03	69.9 ± 1.75	69.8 ± 1.75	69.4 ± 2.17	70.0 ± 1.76	70.5 ± 2.26	68.6 ± 2.57
MCH(pg)	19.2 ± 0.59	19.6 ± 0.46	19.3 ± 0.66	19.0 ± 0.63	19.7 ± 0.47	19.9 ± 0.42	20.0 ± 0.58	19.6 ± 0.74
MCHC(g/dl)	27.6 ± 0.65	27.7 ± 0.95	27.6 ± 0.51	27.2 ± 0.82	28.4 ± 0.64	28.4 ± 0.51	28.4 ± 0.91	28.6 ± 0.65
Platelet($10^3/\mu\text{l}$)	861 ± 166.6	946 ± 124.0	937 ± 130.5	925 ± 102.4	704 ± 131.9	903 ± 149.9*	873 ± 217.2*	909 ± 91.6**
Neutrophil($10^3/\mu\text{l}$)	1.87 ± 0.822	1.21 ± 0.372*	0.89 ± 0.250**	1.09 ± 0.479**	0.97 ± 0.419	0.92 ± 0.464	0.70 ± 0.422	0.72 ± 0.328
Lymphocyte($10^3/\mu\text{l}$)	9.59 ± 5.450	8.93 ± 3.613	6.28 ± 1.403	6.81 ± 1.591	7.15 ± 2.837	6.07 ± 3.356	6.77 ± 3.961	6.11 ± 2.250
Monocyte($10^3/\mu\text{l}$)	0.33 ± 0.209	0.22 ± 0.062	0.12 ± 0.042**	0.14 ± 0.058**	0.20 ± 0.083	0.15 ± 0.036	0.13 ± 0.079	0.14 ± 0.091
Eosinophil($10^3/\mu\text{l}$)	0.18 ± 0.139	0.09 ± 0.050	0.06 ± 0.030**	0.12 ± 0.085	0.21 ± 0.198	0.19 ± 0.150	0.13 ± 0.161	0.12 ± 0.070
Basophil($10^3/\mu\text{l}$)	0.08 ± 0.061	0.08 ± 0.034	0.05 ± 0.016	0.05 ± 0.031	0.07 ± 0.040	0.08 ± 0.031	0.05 ± 0.050	0.04 ± 0.029

*Significant difference from control(P<0.05). **Significant different from control (P<0.01)

성 있게 감소하였고(P<0.01, P<0.01) 수컷 중간용량군에서 호산구수가 유의성 있게 감소하였다(P<0.01). 하지만 여러 측정항목에서 통계적 유의차를 나타냈으나 생리적 정상범위를 벗어나지 않았으며 용량 의존적 변화도 나타나지 않았다(Table 11).

6) 혈액생화학적 검사결과

대조군과 투여군간의 유의성 있는 변화를 보인 항목은 다음과 같다. 암컷 고용량군에서 대조군과 비교하여 ALT의 활성도가 유의성 있게 증가하였으며(P<0.05)

수컷 고용량군, 중간용량군, 저용량군과 암컷 고용량군, 중간용량군에서 total bilirubin량이 유의성 있게 증가하였다(P<0.01, P<0.01, P<0.05, P<0.05, P<0.05). 수컷 고용량군, 저용량군과 암컷 고용량군에서 LDH활성도가 유의성 있게 증가하였다(P<0.01, P<0.05, P<0.01). 수컷 고용량군에서 CK 활성도가 유의성 있게 증가하였다(P<0.01). 수컷 저용량군에서 cholesterol량이 유의성 있게 감소하였다(P<0.05). 암컷 중간용량군과 저용량군에서 triglyceride량이 유의성 있게 감소하였다(P<0.01). 수컷 고용량군, 중간용량군과 저용량군에서

Table 12. Blood chemical values of the rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Item	Male				Female			
	Control	High (100 mg/kg)	Medium (75 mg/kg)	Low (57 mg/kg)	Control	High (100 mg/kg)	Medium (75 mg/kg)	Low (57 mg/kg)
ALT(U/l)	47 ± 13.7	47 ± 9.4	48 ± 7.1	50 ± 8.1	35 ± 7.5	47 ± 10.4**	42 ± 8.4	39 ± 8.3
AST(U/l)	135 ± 28.3	128 ± 18.2	124 ± 9.5	117 ± 11.4	123 ± 25.6	131 ± 23.8	111 ± 16.7	114 ± 24.9
ALP(U/l)	120 ± 32.7	137 ± 41.6	113 ± 15.8	156 ± 49.6	67 ± 19.7	99 ± 39.8	98 ± 39.8	87 ± 38.9
T.Bilirubin(mg/dl)	0.1 ± 0.14	0.5 ± 0.17**	0.3 ± 0.19**	0.3 ± 0.15*	0.2 ± 0.18	0.4 ± 0.15*	0.4 ± 0.19*	0.3 ± 0.16
LDH(U/l)	245 ± 56.2	569 ± 163.2**	337 ± 104.4	351 ± 100.4*	295 ± 130.0	491 ± 156.4*	371 ± 181.1	331 ± 109.0
Albumin(g/dl)	3.9 ± 0.20	4.1 ± 0.37	4.1 ± 0.20	4.1 ± 0.26	4.3 ± 0.19	4.6 ± 0.21	4.4 ± 0.34	4.6 ± 0.50
GGT(U/l)	1.3 ± 2.85	0.8 ± 1.35	1.9 ± 1.86	2.8 ± 6.25	2.1 ± 2.46	3.3 ± 7.19	3.3 ± 3.90	3.8 ± 6.66
CK(U/l)	235 ± 49.1	366 ± 85.3**	245 ± 49.5	239 ± 46.9	314 ± 240.7	331 ± 92.0	345 ± 107.8	297 ± 106.2
BUN(mg/dl)	14 ± 1.5	15 ± 1.9	14 ± 1.5	15 ± 2.3	13 ± 1.6	13 ± 1.6	16 ± 3.2	15 ± 4.1
Creatinine(mg/dl)	0.8 ± 0.05	0.9 ± 0.08	0.9 ± 0.10	0.8 ± 0.05	0.8 ± 0.05	1.0 ± 0.17	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.08
Glucose(mg/dl)	100 ± 16.0	103 ± 15.2	94 ± 5.9	97 ± 8.2	97 ± 9.2	97 ± 8.5	94 ± 9.5	92 ± 7.0
Cholesterol(mg/dl)	64 ± 7.2	70 ± 5.3	65 ± 10.4	55 ± 8.7*	92 ± 18.2	83 ± 14.1	83 ± 11.0	82 ± 11.7
Triglyceride(mg/dl)	59 ± 18.2	82 ± 18.7	63 ± 20.3	59 ± 15.5	77 ± 20.4	81 ± 19.6	51 ± 5.7**	54 ± 11.3**
T.Protein(g/dl)	6.5 ± 0.32	6.5 ± 0.32	6.7 ± 0.21	6.7 ± 0.40	7.0 ± 0.24	7.3 ± 0.32	7.0 ± 0.50	7.0 ± 0.57
I.Phosphorus(mg/dl)	9.7 ± 1.02	9.9 ± 0.84	9.3 ± 0.47	8.9 ± 0.77	8.6 ± 0.65	8.7 ± 0.61	8.8 ± 0.76	9.5 ± 1.96
Calcium(mg/dl)	9.0 ± 0.33	8.1 ± 0.40**	8.6 ± 0.39**	8.7 ± 0.36*	8.9 ± 0.25	8.7 ± 0.35	8.7 ± 0.32	8.8 ± 0.73
Sodium(mEq/l)	154.3 ± 4.30	157.3 ± 3.50	156.1 ± 3.78	156.0 ± 3.53	156.2 ± 4.84	159.3 ± 4.36	151.3 ± 1.62*	151.4 ± 4.11*
Potassium(mEq/l)	8.0 ± 0.71	7.8 ± 1.20	7.3 ± 0.45	7.9 ± 0.52	7.1 ± 0.69	6.9 ± 0.60	6.8 ± 0.36	7.9 ± 1.04*
Chloride(mEq/l)	94 ± 3.1	94 ± 2.9	92 ± 2.3	93 ± 2.5	93 ± 3.0	93 ± 1.8	92 ± 2.5	94 ± 3.1
A/G ratio	1.5 ± 0.17	1.8 ± 0.59	1.6 ± 0.15	1.6 ± 0.14	1.6 ± 0.16	1.7 ± 0.20	1.7 ± 0.17	2.0 ± 0.53*

*Significant difference from control(P<0.05). **Significant different from control (P<0.01)

calcium량이 유의성 있게 감소하였다 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$). 암컷 중간용량군과 저용량군에서 sodium량이 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$, $P<0.05$). 암컷 저용량군에서 potassium량이 유의성 있게 증가하였다($P<0.05$). 암컷 저용량군에서 알부민 글로블린 비율이 유의성 있게 증가하였다($P<0.05$). 하지만 여러 측정항목에서 통계적 유의차를 나타냈으나 생리적 정상범위를 벗어나지 않았으며 용량 의존적 변화도 나타나지 않았다 (Table 12).

7) 뇨 검사결과

대조군과 비교하여 처치군에서 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다(Table 13).

8) 조직병리검사결과

생존한 예에서 심장의 경우 자연 국한성 심근염증(spontaneous focal myocardial inflammation, spontaneous cardiomyopathy)이 대조군 수컷 2예, 고용량군 수컷 1예에

서 관찰되었으며 심내막하 증식(subendocardial proliferation)이 중간용량군 수컷 1예, 고용량군 수컷 1예에서 관찰 되었다. 간장의 경우 미세육아종(microgranuloma)을 동반하거나 동반하지 않은 국한성 염증(focal inflammation)이 대조군 수컷 3예, 암컷 4예, 저용량군 수컷 3예, 암컷 2예, 중간용량군 수컷 1예, 암컷 3예, 고용량군 수컷 1예, 암컷 3예에서 관찰되었으며 간실질의 낭성변성(cystic degeneration)은 대조군 수컷 1예에서 관찰되었다. 신장의 간질성 신염(interstitial nephritis)은 저용량군 수컷 1예, 중간용량군 암컷 1예, 고용량군 수컷 1예에서 관찰되었으며 세뇨관내 무기질침착(intratubular mineralization)이 대조군 수컷 1예, 저용량군 암컷 1예에서 관찰 되었다. 폐장의 경우 간질성 폐렴이 대조군 수컷 4예, 암컷 4예, 저용량군 수컷 3예, 암컷 1예, 중간용량군 수컷 4예, 암컷 2예, 고용량군 수컷 1예, 암컷 4예에서 관찰되었다(Table 14, 15).

심장의 자연 국한성 심근염증은 원인은 분명하지 않으나 발생정도와 발생연령은 식이, 환경과 스트레스에

Table 14. Incidence of non-neoplastic microscopic findings in male rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Group	Control	Low (57 mg/kg)	Middle (75 mg/kg)	High (100 mg/kg)
Heart	*Ex10	10	10	7
Spontaneous focal myocardial inflammation	2	0	0	1
Subendocardial proliferation	0	0	2	1
Liver	*Ex10	10	10	7
Focal in flammation with/without microgranuloma	3	3	2	1
Cystic degeneration	1	0	0	0
Fatty change	0	0	0	0
Kidney	*Ex10	10	10	7
Interstitial nephritis	0	1	0	1
Intratubular mineralization	1	0	0	0
Lung	*Ex10	10	10	7
Interstitial pneumonia	4	3	4	1
Spleen	*Ex10	10	10	7

*Ex : number of examined animals.

Table 15. Incidence of non-neoplastic microscopic findings in female rats intravenously injected with water soluble DDB derivative for 31 days

Group	Control	Low	Middle	High
Heart	*Ex10	10	9	9
Spontaneous focal myocardial inflammation	0	0	0	0
Subendocardial proliferation	0	0	0	0
Liver	*Ex10	10	9	9
Focal in flammation with/without microgranuloma	4	2	3	3
Cystic degeneration	0	0	0	0
Fatty change	0	0	0	0
Kidney	*Ex10	10	9	9
Interstitial nephritis	0	0	1	0
Intratubular mineralization	0	1	0	0
Lung	*Ex10	10	9	9
Interstitial pneumonia	4	1	2	4
Spleen	*Ex10	10	9	9

*Ex : number of examined animals.

의해 영향을 받는다고 되어있으며 대조군에서 관찰되는 점으로 보아 투여물질에 의한 소견으로 생각되어지지 않는다. 국한성 심내막하 증식은 괴사성 심내막하 손상(ischemic subendocardial damage), 심내막염증(endocarditis) 또는 심혈행 이상(abnormal cardiac blood flow)후에 발생하거나 별다른 처치를 하지 않은 노령의 랫드에서도 발생이 보고되어 있다. 또한 발암물질 등의 화학물질에 의해서도 발생될 수 있는 것으로 되어 있다.

간장의 국한성 염증은 별다른 처치를 하지 않은 실험동물에서 관찰되며 원인은 분명하지 않으며 비특이적인 것으로 되어 있고, 미세육아종도 종종 대조군 실험동물에서 관찰된다고 한다. 간장의 양성 변성은 고령의 랫드에서 자연적으로 발생되기도 하며 발암물질을 투여 후에도 발생하기도 한다고 되어 있으나 대조군에서 관찰되는 점으로 보아 투여 물질에 의한 소견으로 생각되어지지 않는다. 간장의 지방변성은 화학물질이나 약물에 의하여 유발되거나 산발성으로 발생하는 경우 영양성, 대사성 또는 호르몬 이상에 의해서도 발생한다고 되어 있다.

신장의 간질성 신염은 화학물질이나 약물에 의해서 유발된 수도 있으며 다른 신장성 병변과 동반하여 나타날 수 있으나 독성시험에서는 국한성 염증세포 침윤이 원인없이 자연적으로 발생될 수 있다고 되어있다. 신장의 세뇨관내 무기질 침착은 그 병리기전은 완전히 밝혀지지 않았지만 환경 또는 영양성 요인도 그 원인으로 생각되며 대조군에서도 관찰되는 점으로 보아 투여물질에 의한 소견으로 생각되지 않는다.

폐장의 간질성 폐렴은 장기간의 동물사육에 의한 환경적 요인으로 추정되며 대조군에서도 관찰되어 투여물질에 의한 소견으로 생각되지 않는다.

IV. 결 론

1. 랫드에 있어서 수용성 DDB 유도체를 최고용량군 400 mg/kg, 고용량군 307 mg/kg, 중등용량군 236 mg/kg, 저용량군 182 mg/kg, 최저용량군 140 mg/kg 등 5개 투여군과 생리식염수를 대조물질로하여 1회 정맥주사한 급성독성 시험결과 주요임상증상은 진전, 활동성 감소, 심한 통증을 수반한 경련이었고 체중변화 및 육안적 해부소견 등에서 시험물질에 기인한 특이한 이상소견이 관찰되지 않았으며, LD₅₀은 수컷 244.1 mg/kg, 암컷 232.5 mg/kg 이었다.

2. 1개월 아급성독성시험의 경우, 시험물질을 57, 75, 100 mg/kg/day의 용량으로 SD계 암·수 랫드에 1일 1회 주6회 총 28일간 정맥주사한 시험 결과, 임상증상은 활동성감소 및 진전 등이었고 혈액 및 혈액생화학적 검사에서 대조군에 비해 유의성있는 통계학적인 변화가 관찰되었으나 정상적인 생리적 정상범위였으며 또한 조직병리학적 검사에서 몇몇 이상소견이 관찰되었으나 환경등의 원인으로 생각되며 투여물질에 기인하지는 않은 것으로 생각된다. 본 실험조건에서 수용성 DDB유도체에 대한 무독성량(무해용량)은 57 mg/kg/day로 추정된다.

참고문헌

- Graves, M. B. (1990): Histopathology of preclinical toxicity studies. Elsevier science publish company, New York.
- Gray A. B., Scot, L. E. and Michael, R. E. (1990): Pathology of Fischer rat, Academic press, San Diego.
- Gopinath, C., Prentice, D. E. and Lewis, D. J. (1987): Atlas of experimental toxicological pathology. MTP Press Limited, Norwen.